

İçme-kullanma sularında rotavirüs varlığının EPA 1615 yöntemi ile tespitinin uygulanabilirliği

Applicability of rotavirus existence in drinking water samples with EPA 1615 method

Özgül SEMİZOĞLU¹, Zehra İrem ERİŞ¹, Fatma KARADENİZ-DURSUN¹, Şule ŞENSES-ERGÜL¹,
Edibe Nurzen NAMLI-BOZKURT²

ÖZET

Amaç: Gastroenteritler, dünya çapında özellikle beş yaş altı çocukları etkileyen ve ölümlere sebep olan önemli bir hastalık olup salgın durumunda salgın kaynağının kısa sürede ve doğru bir şekilde tespitinin yapılması halk sağlığının korunması açısından büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada, uluslararası standart bir yöntem olan EPA 1615 yönteminin uygulanabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada ilk olarak, 10 L su örneği, klinik örneklerden izole edilmiş rotavirüs izolatu ile kirletilmiştir. Daha sonra kirletilmiş su örnekleri adsorbsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Adsorbsiyon işlemi NanoCeram® (Argonide, U.S.A.) filtre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kirletilmiş su örneği adsorbsiyon işlemi sonrası elüe edilmiştir. Elüsyon işlemi Beef Extract solüsyonu kullanılarak yapılmıştır. Elüsyon işlemi tamamlanan su örneğine organik flokülasyon işlemi uygulanmıştır. Organik flokülasyon işlemine geçmeden önce elde edilen elüatın pH değeri EPA 1615 standardında belirtilen değere ayarlanmıştır. Organik flokülasyon işlemi sonucunda elde edilen süpernatanın pH değeri tekrar ayarlanmıştır. Süpernatın, 30.000 MWCO tüpler ile santrifüj edilerek yoğunlaştırma işlemi tamamlanmıştır.

ABSTRACT

Objective: Gastroenteritis particularly affects children under the age of five worldwide. In case of an epidemic, determining the source of the epidemic in a short time and accurately is of great importance for the protection of the public health. In this study, it is aimed to demonstrate the applicability of the EPA 1615 method, which is an international standard method.

Methods: In the study, firstly 10 L of water sample was contaminated with rotavirus isolate extracted from clinical samples. Afterwards, adsorption process was performed for the contaminated water sample. The adsorption process was achieved by using NanoCeram® (Argonide, U.S.A.) filter. Contaminated water sample was eluted after the adsorption process. The elution process was performed by using Beef Extract solution. Organic flocculation was applied to the eluted water sample. Before the organic flocculation process, the pH value of the eluate was adjusted to the defined value in the EPA 1615 standard. After the organic flocculation step, the pH value of the supernatant was adjusted again. Concentration process was completed by centrifugating supernatant in the 30.000 MWCO tubes. Then, viral

¹Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Tüketici Güvenliği ve Halk Sağlığı Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı, Ulusal Halk Sağlığı Referans Laboratuvarı, Mikrobiyolojik Analiz Laboratuvarları, Ankara

²Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Tüketici Güvenliği ve Halk Sağlığı Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı, Ankara

İletişim / Corresponding Author : Özgül SEMİZOĞLU

Adnan Saygun Caddesi, Sağlık Mahallesi, No: 55 B Blok Kat: 1 Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : ozgulkucuk@yahoo.com

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.73626

Semizoğlu Ö, Eriş Zİ, Karadeniz-Dursun F, Şenses-Ergül Ş, Namlı-Bozkurt EN. İçme-kullanma sularında rotavirüs varlığının EPA 1615 yöntemi ile tespitinin uygulanabilirliği. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(EK4: Su ve Sağlık): 65-70

Santrifügasyondan sonra elde edilen yoğunlaştırılmış su örneğine viral RNA izolasyonu uygulanmıştır. Çalışmada viral RNA izolasyonu, QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Crawley-UK) ile EPA 1615 standardının tanımladığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İzole edilen viral RNA örneğinin amplifikasyon işlemi ise The RealStar® Rotavirus RT-PZR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Germany) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda Qiagen Rotor-GeneQ cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: 10 L su örneğine eklenen rotavirüs izolat dilüsyonlarına sırası ile adsorpsiyon-elüsyon, santrifügasyon, viral RNA izolasyonu ve RT-PZR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) işlemleri uygulanmıştır. Üç farklı rotavirüs dilüsyonu ile kirletilen içme-kullanma su örneklerine ait analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; EPA 1615 Standart yöntemi ile rotavirüs varlığı tespit edilebilmiştir. Ayrıca çalışmamızda RT-PZR çalışma prensibine uygun olarak, azalan rotavirüs konsantrasyon değerlerine göre cycle threshold (Ct) değerlerinin de yükseldiği belirlenmiştir.

Sonuç: Rotavirüs suşunun üç farklı konsantrasyonu ile kirletilen içme-kullanma su örnekleri ile elde edilen sonuca göre EPA 1615 Standardının laboratuvarında analiz edilecek su numunelerinde uygulanabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Elektropozitif filtre, rotavirüs, gastroenterit, EPA 1615 metot, RT-PZR

RNA isolation was applied to the concentrated water sample. For this purpose, viral RNA isolation method defined by the EPA 1615 standard is accomplished with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Crawley-UK). The amplification of the isolated viral RNA sample was performed using the RealStar® Rotavirus RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Germany) using the Qiagen Rotor-GeneQ device according to the manufacturer's instructions.

Results: Adsorption-elution, centrifugation, viral RNA isolation and RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) steps were respectively applied to 10 L of water samples inoculated with Rotavirus dilutions. When the results of drinking water samples which were inoculated with three different dilutions of rotavirus are evaluated together, rotavirus presence can be detected by EPA 1615 Standard method. Additionally in this study, it was determined that Ct values increased according to decreasing rotavirus concentration values, in accordance with the principle of RT-PCR process.

Conclusion: According to the results obtained with drinking water samples contaminated with three different concentrations of rotavirus strain, EPA 1615 Standard was shown to be applicable in water samples analyzed in the laboratory.

Key Words: Electropositive filter, rotavirus, gastroenteritis, EPA 1615 method, RT-PCR

GİRİŞ

Temiz su kaynaklarına erişim, halk sağlığının korunmasında en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Su kaynaklı hastalıklar ve bunlarla ilişkili olarak öne çıkan patojen mikroorganizmalar dünyada önemli bir sorun olarak kabul edilmektedir (1).

Enterik virüsler, tüm dünyada su kaynaklı hastalıkların başlıca nedenlerindedir ve içme suyundaki düşük miktar bile önemli bir enfeksiyon

nedeni olabilir. Rotavirüsün neden olduğu birçok su kaynaklı salgın rapor edilmiştir (2). Rotavirüs tüm dünyada yenidoğan ve çocuklarda görülen gastroenteritlerin en yaygın ve en önemli sebeplerinden birisi olarak tanımlanmaktadır. Rotavirüs enfeksiyonlarına bağlı olarak her yıl yaklaşık 2.000.000 çocuk hastaneye yatmakta ve 450.000 çocuğun ise kaybedildiği rapor edilmektedir (3, 4).

Türkiye’de ise beş yaş altı çocuklarda gastroenterit nedeni ile hastaneye yatışlarda etkenin %32,4-%67,4 oranında rotavirüs olduğu gösterilmiştir (5).

Su örneklerinde virüs tespit etmede en büyük güçlük su ortamında virüs miktarının düşük olmasıdır. Su ortamındaki düşük konsantrasyonundan dolayı, virüs belirleme analizlerinde, hem yüksek hacimli su örneklerinin çalışılması hem de konsantrasyon yöntemlerinin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (6-9). Su kaynaklı gastroenterit salgını durumlarında etkenin belirlenebilmesi için genel yaklaşım, su örneğinin farklı metotlarla konsantre edilmesi ve RT-PZR işlemleri uygulanarak sonuca ulaşılmasıdır. Çalışmamızda; su kaynaklı gastroenterit salgınlarında kaynağın tespit edilebilmesi için, su örneklerinde rotavirüs varlığının laboratuvarımız koşullarında EPA-1615 standardı ile uygulanabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır (10).

GEREÇ VE YÖNTEM

Su örneklerinde rotavirüs varlığının laboratuvarımız koşullarında EPA-1615 standardı ile uygulanabilirliğinin gösterilmesinin amaçlandığı çalışmamızda, içme kullanma suyu örnekleri gaitadan izole edilen rotavirüs süşunun üç farklı dilüsyonu ile kirlenmiştir. Kirlenilen su örnekleri EPA 1615 Standart yöntemine göre adsorbsiyon-elüsyon-izolasyon işlemlerine tabi tutulmuştur(10). Çalışmanın son aşamasında ise izole edilen RNA örneklerine valide ticari kit olan RealStar® Rotavirus RT-PZR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Germany) kullanılarak RT-PZR analizi gerçekleştirilmiştir.

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarlarından temin edilen rotavirüs içeren gaita numunelerinden 1:10, 1:100 ve 1:1000 olacak şekilde rotavirüs süşansiyonları hazırlanmıştır. Bu süşansiyonların her birinden sırasıyla 150 µL alınıp, 10 L su numuneleri içerisine aşılanmıştır. Aşılama sırasında mevcut su numunelerine 100 µL mengovirüs (4,21x10⁵ copy/µL-(Ceeram, France) de

eklenmiştir. Mengovirüs laboratuvarımızdaki mevcut in-house tangential ultrafiltrasyon yönteminin süreç kontrolünde kullanılan yapay olarak üretilen ve miktarı bilinen kontrol virüsüdür. Belirtilen oranlarda rotavirüs ve mengovirüs aşılması yapılan örnekler iki paralelli olacak şekilde çalışılmıştır.

EPA 1615 Standart yöntemine göre Nanoceram® VS2.5-5 Filtre (Argonid, A.B.D.) kullanılmıştır (10). 10 L hacimdeki su numunesi peristaltik pompa (Watson Marlow, UK) kullanılarak 1.5 L/dak’lık akış hızında filtreden geçirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Su örneklerinin EPA 1615 yöntemine göre filtrasyon düzeneği.

Filtrasyon sonrasında pH 9,0 olan %1,5 Beef Ekstrakt ile filtrenin elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplanan eluatın pH’ı 3,5 olacak şekilde tekrar pH ayarlaması yapılmıştır. Organik flokülasyon işleminde eluat; 4°C sıcaklık, 2500xg hız ve 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Falkon tüplerine toplanan örnek 4°C sıcaklıkta, 4000xg hızda ve 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatanın pH’sı 7,0-7,5 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Organik flokülasyon işlemi sonunda elde edilen örnekler, 30.000 MWCO Vivaspin 20 (Sartorius) tüpleri ile 4°C sıcaklıkta,

6000xg hızda santrifüj edilerek konsantrasyon (yoğunlaştırma) işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonunda 400 µL örnek elde edilmiştir.

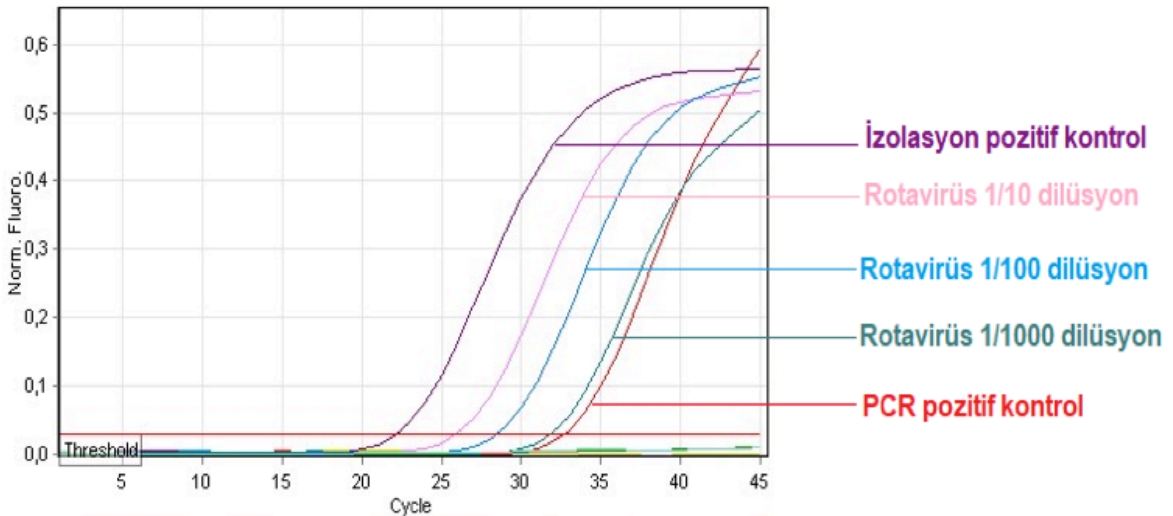
Örnekten RNA izolasyonu QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Crawley, UK) kullanılarak EPA 1615 metoduna uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen viral RNA'nın Real-Time PZR analizi ise RealStar® Rotavirus RT-PZR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Germany) ve Mengovirus@ ceeramTools™ (Ceeram, France) kitleri ile Qiagen Rotor-GeneQ kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT-PZR amplifikasyonları; toplam 45 döngü olacak şekilde programlanmıştır. Rotavirüs için RT-PZR programı; 55°C'de 20 dakika, 95°C'de 02 dakika, 95°C'de 15 saniye, 55°C'de 45 saniye, 72°C'de 15 saniye ve Mengovirüs için RT-PZR programı 45°C'de 10 dakika, 95°C'de 10 dakika, 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 45 saniye şeklinde gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Su örneklerinde rotavirüs varlığının laboratuvarımız koşullarında EPA-1615 standardı ile uygulanabilirliğinin gösterilmesinin amaçlandığı

çalışmamızda; rotavirüs suşunun üç farklı dilüsyonu ve mengovirus (CeeramTools, France) ile kirletilen su örnekleri adsorbsiyon-elüsyon-izolasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Çalışmanın son aşamasında ise izole edilen RNA örneklerine valide ticari kit kullanılarak RT-PZR analizi uygulanmış ve bu çalışma iki kez tekrarlanmıştır. Bütün analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; EPA 1615 Standart yöntemi ile rotavirüs varlığı tespit edilebilmiş (Şekil 3) ancak kontrol virüsü olarak eklenen mengovirüs tespit edilememiştir. Söz konusu kontrol virüsünün, EPA 1615 metodu için uygun olmadığı yaptığımız bu çalışma ile belirlenmiştir. Aynı zamanda filtrasyon aşaması için analize dahil edilecek konsantrasyonu bilinen bir rotavirüs suşu bulunmadığından analizlerimiz gaita numunesinden izole edilen ve virüs yükü bilinmeyen izolat üzerinden gerçekleştirilmiştir. Şekil 3 ve 4'te, azalan rotavirüs konsantrasyon değerlerine göre cycle threshold (eşik döngüsü) değerlerinin uyumlu olarak yükseldiği gösterilmiştir.

Çevresel su örneklerinden virüs tespit çalışmalarında, su ortamında virüs örneğinin seyrelmesi sebebi ile virüs konsantrasyonunun yapıldığı ilk basamak en önemli basamağı oluşturmaktadır.



Şekil 2. Rotavirüs dilüsyon örneklerinin RealStar® Rotavirus RT-PZR Kit 1.0 ile yapılan amplifikasyon görüntüsü.

No.	Colour	Name	Type	Ct
1	■	PCR pozitif kontrol	Positive Control	32,64
2	■	PCR negatif kontrol	Negative Control	
3	■	Izolasyon pozitif kontrol	Positive Control	22,10
4	■	Izolasyon negatif kontrol	Negative Control	
5	■	Rota 1/10	Unknown	25,86
6	■	Rota 1/100	Unknown	28,47
7	■	Rota 1/1000	Unknown	31,78

Şekil 3. Rotavirüs dilüsyon örneklerinin karşılaştırmalı cycle treshold (Ct) değerleri.

Çalışmamızda, bu basamak için literatürde EPA 1615 metodunun salgın sahasında filtrasyon olanağı sağlaması ve yüksek hacimlerde su örneği geçirilmiş filtrelerin laboratuvara ulaştırılması gibi avantajlara sahip olduğu belirtilmektedir (11). Laboratuvarda yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre, EPA 1615 Standardının laboratuvarda analiz edilecek su numunelerinde uygulanabileceği gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Dünyada su kaynaklı gastroenterit salgınlarında, salgın etkeninin tespit edilmesi halk sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Virüs kaynaklı salgınlarda, su örneklerinde etkenin seyreltik olarak bulunması virüs tespit çalışmalarını güçleştirmektedir. Dünyada su örneklerinden virüs tespitine yönelik farklı metotlar uygulanmaktadır (12). Yapılan araştırmalar sonucunda; elektropozitif filtre kullanılarak virüs tespit etme çalışmalarının yaygın olarak uygulandığı görülmüştür (13-17).

EPA 1615 standart metodu ile yaptığımız çalışma sırasında; özellikle organik flokülasyon aşamasında pH ayarlamalarının yapılması gerekliliği, manuel

ayarlamalar gibi müdahalelerin bulunması yöntemin en önemli zorlukları olarak belirlenmiştir.

Bunun yanısıra metodunun standart geçerli kılınmış bir metot olması önemlidir. Virüs örneğinin su kaynaklarında seyrelmiş halde bulunması nedeni ile virüs kaybının önlenmesi için yüksek hacimlerde su örneklerinin analiz edilmesi gerekmektedir. EPA 1615 standardında da, elektropozitif filtreler doğrudan salgın sahasında kullanılabilen ve büyük hacimlerde su örneği filtreden geçirilebilmektedir (11). Böylelikle yüksek hacimli su örneklerinin laboratuvara gönderilmesi yerine, sadece su örneği geçirilmiş filtrenin laboratuvara gönderilmesi taşıma açısından büyük bir avantajdır.

Ayrıca çalışmamızda, azalan rotavirüs konsantrasyon değerlerine göre cycle threshold (Ct) değerlerinin de uyumlu olarak yükseldiği belirlenmiştir. RT-PZR çalışmasında yoğun nükleik asit içeren örnekler, threshold değerini daha erken geçeceği için Ct değerleri düşük olmaktadır. Aynı şekilde düşük yoğunlukta nükleik asit içeren örnekler, threshold değerini daha geç geçeceği için Ct değerleri yüksek olmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz Ct değerlerinin de RT-PZR analiz prensibi ile uyumlu

olduğu görülmüştür (18).

Rotavirüs suşunun üç farklı konsantrasyonu ile kirletilen içme-kullanma su örnekleri ile elde edilen sonuca göre EPA 1615 Standardının laboratuvarında

analiz edilecek içme-kullanma su numunelerinde uygulanabileceği gösterilmiştir. Çalışmanın bir sonraki aşaması yöntemin farklı enterik virüsler (norovirus, enterovirüs) ile uygulanabilirliğinin belirlenmesi olacaktır.

KAYNAKLAR

- Gajadhar AA, Allen JR. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Vet Parasitol*, 2004; 126: 3-14.
- Kittigul L, Khamoun P, Sujirarat D, Utrarachkij F, Chitpirom K, Chaichantanakit N, et al. An improved method for concentrating rotavirus from water samples. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001; 96, 815-821.
- Wang H, Liddell CA, Coates MM, Mooney MD, Levitz CE, Schumacher AE, et al. Global, regional, and national levels of neonatal, infant, and under-5 mortality during 1990-2013. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2014; 384: 957-79.
- Liu L, Oza S, Hogan D, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*, 2015; 385: 430-440.
- Ceyhan M, Alhan E, Salman N, et al. Multicenter prospective study on the burden of rotavirus gastroenteritis in Turkey, 2005-2006: a hospital-based study. *J Infect Dis* 2009; 200 Suppl 1: 234-8.
- Ikner LA, Soto-Beltran M, Bright KR, New Method Using a Positively Charged Microporous Filter and Ultrafiltration for Concentration of Viruses from Tap Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011; 77(10), 3500-3506.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002; 68(3), 1033-1039.
- Lawrence JE, Steward GF. Purification of viruses by centrifugation. *Manual of Aquatic Viral Ecology*, 2010; 17, 166-181.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J. A Review: Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology*, 2001;91, 945-962.
- EPA Method 1615: Measurement of Enterovirus and Norovirus Occurrence in Water by Culture and RT-qPCR, 2012.
- Shay Fout G, Cashdollar JL, Varughese EA, Parshionikar SU, Grimm AC. Measurement of enterovirus and norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR. I. collection of virus samples. *J Vis Exp*, 2015; (97): e52067, 1-7.
- Kaynar P, Yılmaz M, Semizoğlu Ö, Eriş Zİ, Karadeniz Dursun F, Cesaretli Y ve ark. Su örneklerinde norovirüs varlığının cross-flow mikrofiltrasyon ve RT-PCR ile belirlenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2017; 74 (EK-1): 1-6.
- Cashdollar JL, Brinkman NE, Griffin SM, McMinn BR, Rhodes ER, Varughese EA, et. al. Development and evaluation of EPA method 1615 for detection of enterovirus and norovirus in water. *Appl Environ Microbiol*, 2013; 79 (1): 215-23.
- Bennett, H.B., O'Dell, H.D., Norton, G., et. al. Evaluation of a novel electropositive filter for the concentration of viruses from diverse water matrices. *Water Sci Technol.*, 2010; 61, 317-22.
- Cashdollar, J.L. and Dahling, D.R. Evaluation of a method to re-use electropositive cartridge filters for concentrating viruses from tap and river water. *J Virol Methods*, 2006; 132, 13-17.
- Gibbons D, Rodriguez RA, Tallon L, Sobsey MD. Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of noroviruses, adenoviruses and male-specific coliphages from seawater. *J Appl Microbiol*, 2010; 109, 635-41.
- Karim MR, Rhodes ER, Brinkman N, Wymer L, Fout GS. New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water. *Appl Environ Microbiol*, 2009; 75: 2393-9.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersal L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Exprt Rev Mol Diagn*, 2005; 5(2): 209-19.